

На правах рукописи

ЧЕРЁМИН АНДРЕЙ МИХАЙЛОВИЧ

**МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ СЕРИНОВЫХ
ПРОТЕИНАЗ *BACILLUS PUMILUS* 7P**

03.02.03 – Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань – 2014

Работа выполнена в лаборатории биосинтеза и биоинженерии ферментов кафедры микробиологии Института фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

Научный руководитель: Доктор биологических наук, профессор
Шарипова Маргарита Рашидовна

Официальные оппоненты: Доктор ветеринарных наук, профессор
Фаизов Тагир Хадиевич
главный научный консультант научно-инновационного центра Федерального центра токсикологической, радиационной и биологической безопасности, г. Казань

Кандидат биологических наук,
Кипенская Лариса Викторовна
доцент кафедры микробиологии Государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Казанская государственная медицинская академия» Минздрава РФ, г. Казань

Ведущая организация: Федеральное бюджетное учреждение науки
«Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии»
Роспотребнадзора, г. Казань

Защита диссертации состоится «29» декабря 2014 г. в 13 часов на заседании диссертационного совета Д 212.081.08 при ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: г. Казань, ул. К. Маркса, д. 74, Институт фундаментальной медицины и биологии в зале заседания ученого совета.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке им. Н. И. Лобачевского при ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: г. Казань, ул. Кремлевская, д. 35.

Автореферат разослан « » ноября 2014г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук, профессор



З. И. Абрамова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Сериновые протеиназы обнаружены у животных, растений, грибов, архей, бактерий и вирусов и представляют интерес, как с точки зрения физиологии микроорганизмов, так и их практического применения. Потребность в таких белках у эу- и прокариот, а также широкий спектр выполняемых функций, характеризуют сериновые протеиназы как эволюционно древние ферменты. В процессе эволюции, адаптация на молекулярном и физиологическом уровнях прокариотических организмов позволила им выживать в любой экологической нише. Определенную роль в этом сыграли сериновые протеазы. Участие в регуляторном протеолизе, патологических состояниях, споруляции и образовании других покоящихся форм, делают протеазы незаменимыми в решении разных проблем современной биологии и медицины. Обладая широкой субстратной специфичностью, стабильностью в широком диапазоне температур, высокой каталитической активностью, сериновые протеиназы представляют интерес в биотехнологии. Микроорганизмы являются предпочтительным источником этих ферментов из-за быстрого роста, доступности и перспективности генно-модифицированных штаммов продуцентов. Выяснение механизмов регуляции генной активности соответствующих генов позволит контролировать синтез этих белков и получать новые перспективные генетически модифицированные штаммы бактерий.

Именно поэтому, изучение организации генов сериновых протеиназ и регуляции их транскрипционной активности необходимо для понимания физиологических процессов клетки, находящихся под контролем протеиназ, и создания биотехнологических штаммов-продуцентов.

Степень разработанности темы исследования. Разработка диссертационной темы начата на основе предварительных экспериментальных данных, полученных в Казанском государственном университете (Leschinskaya et al., 1997; Балабан с соавт., 1993). В настоящее время ферменты субтилизиноподобная протеиназа и глутамилэндопептидаза выделены и очищены из культуральной жидкости, изучены их основные свойства (Михайлова с соавт., 2009; Балабан с соавт., 2003). Изучено действие стрессовых факторов на биосинтез ферментов и выявлены особенности экспрессии генов (Каюмов, 2006; Частухина с соавт. 2004, 2005). Показано наличие тромболитической и фибринолитической активностей сериновых протеиназ (Данилова с соавт., 2012). Гены белков изолированы и установлена их нуклеотидная последовательность (Rebrikov et al., 1999; Sharipova, 2008). Определены оптимальные длины промоторов генов субтилизиноподобной протеиназы и глутамилэндопептидазы (Тойменцева, 2012). Однако остается малоизученным устройство генов ферментов, а также механизмы активации генов в сети сигнальной трансдукции. Эта задача решалась в ходе работы.

Цель и задачи исследований. Целью данной работы являлось выяснение механизмов взаимодействия промоторов генов сериновых протеиназ *Bacillus pumilus* 7P с регуляторными факторами стационарной фазы роста бактерий.

В соответствии с поставленной целью работы решались следующие задачи:

1. Исследовать экспрессию генов сериновых протеиназ *B. pumilus* в мутантах по транскрипционным факторам стационарной фазы роста
2. Определить направление и стартовые точки транскрипции генов сериновых протеиназ *B. pumilus* в системе *in vitro*
3. Установить взаимодействие транскрипционных факторов (Spo0A и DegU~P) с промоторами генов сериновых протеиназ в системе *in vitro*
4. Модифицировать потенциальные регуляторные сайты связывания с белком DegU~P в промоторе гена сериновой протеиназы и изучить экспрессию модифицированного гена

Научная новизна. Все результаты, изложенные в диссертационной работе, получены впервые. Впервые установлено *in vitro*, что фосфорилированная форма транскрипционного фактора DegU~P взаимодействует с промотором гена субтилизиноподобной протеиназы и не связывается с промотором глутамилэндопептидазы. Транскрипционный фактор Spo0A взаимодействует с промоторами обоих генов. Определены стартовые точки транскрипции генов сериновых протеиназ. Модификация одного из потенциальных регуляторных сайтов для связывания с белком DegU~P гена субтилизиноподобной протеиназы позволила увеличить экспрессию гена.

Теоретическая и практическая значимость работы. Впервые в системе *in vitro* получены данные о взаимодействии промоторов генов сериновых протеиназ *B. pumilus* с транскрипционными факторами стационарной фазы роста. Выявлены разные способы контроля генов протеиназ с различной специфичностью. Установлен сегмент промотора – сайт регуляции, модификация которого привела к увеличению транскрипционной и трансляционной активности гена субтилизиноподобной протеиназы. Впервые получен модифицированный промотор гена субтилизиноподобной протеиназы, повышающий уровень транскрипции в 53 раза. Такой подход может быть применен при создании штаммов-продуцентов целевых белков, экспрессия которых происходит без изменения первичной структуры.

Положения, выносимые на защиту:

1. Промотор гена субтилизиноподобной протеиназы *B. pumilus in vitro* взаимодействует с транскрипционными факторами Spo0A и DegU~P
2. Промотор гена глутамилэндопептидазы *B. pumilus in vitro* взаимодействует с транскрипционным фактором Spo0A и не связывается с транскрипционным фактором DegU~P
3. Модификация сайта взаимодействия с регуляторным белком DegU~P в промоторе гена субтилизиноподобной протеиназы привела к увеличению экспрессии.

Степень достоверности результатов проведенных исследований подтверждается большим объемом многократных лабораторных экспериментов, выполненных и анализированных на современных высокоточных приборах; опубликованием полученных данных в отечественных журналах, с рецензированием ведущими учеными в данной области.

Апробация работы. Основные положения диссертации представлены на следующих конференциях: «Конгресс русского сообщества биохимиков и молекулярных биологов» (Новосибирск, 2008), «XLVI международная научная студенческая конференция «Студент и научно-технический прогресс» (Новосибирск, 2008); 13th annual Symposium for Biology Students of Europe «Symbiose 2009» (Kazan, 2009); XIV international conference “Microbial enzymes in biotechnology and medicine” devoted to the 20th anniversary of partnership between Kazan State University and Justus-Liebig Giessen University. (Kazan, 2009); 14th international conference “Microbial enzymes in biotechnology and medicine”. (Kazan, 2009); IV Russian symposium called “Protein and Peptides”. (Kazan, 2009); «Актуальные проблемы современной биохимии и молекулярной биологии», (Минск, 2010); V российский симпозиум «Белки и пептиды» (Петрозаводск, 2011); международная конференция «Биология – наука XXI века» (Москва, 2012); IV Международная 3D интернет-конференция «Актуальные проблемы биохимии и бионанотехнологий» (Казань, 2013); Всероссийская конференция «Протеолитические ферменты: Структура, функции, эволюция» (Петрозаводск, 2014).

Связь работы с научными программами и собственный вклад автора в исследования. Работа выполнена в рамках государственной программы повышения конкурентоспособности «Казанского (Приволжского) федерального университета» среди ведущих мировых научно-исследовательских центров, а также, частично, за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности. Исследования выполнены при поддержке грантов: РФФИ 09-04-99044-р-офи, 14-34-50792 - мол_нр; Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России»: ГК № П323, № П344, № П406, № П1053, № 14.132.21.1766, № 16.740.11.0741, № 14.A18.21.0849.

Личный вклад автора заключается в разработке основной проблемы исследования, планировании, организации и реализации её экспериментального решения, интерпретации полученных результатов.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 16 работ, из них 5 статей в Российских изданиях, включенных в список Высшей аттестационной комиссии (ВАК), 11 материалов международных и Всероссийских конференций.

Общая структура диссертации. Общий объем диссертации 112 страниц. Диссертация включает разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты исследований, обсуждение результатов, выводы, список литературы. Работа содержит 7 таблиц и 32 рисунка. Список литературы включает 155 источников, в том числе 136 работ зарубежных авторов.

Благодарности. Автор выражает глубокую признательность своему научному руководителю – д.б.н., профессору, Шариповой Маргарите Рашидовне за внимательное отношение к работе, плодотворное обсуждение полученных результатов, помощь в подготовке материалов для публикаций и постоянную поддержку на всех этапах работы. Автор благодарит: к.б.н., М.В. Захарову за возможность проведения экспериментов с радиоактивной меткой на базе

лаборатории молекулярной микробиологии ИБФМ РАН, г.Пушино, а также за ценные рекомендации по исследованиям; к.б.н., А.Ю. Горбачева, за помощь в проведении части экспериментов в лаборатории протеомного анализа НИИ ФХМ, г. Москва; Е.Е. Черенкову, аспиранта кафедры генетики КФУ, за помощь в освоении методики «ПЦР в режиме реального времени». Также автор благодарит всех сотрудников лаборатории биосинтеза и биоинженерии ферментов КФУ, всех сотрудников кафедры микробиологии, за помощь в организации экспериментов и доброжелательную рабочую атмосферу.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы бактерий, плазмидные векторы и условия культивирования.

В работе использовали штаммы из музея лаборатории Биосинтеза и Биоинженерии Ферментов КФУ - *B. pumilus* 7P, штамм *B. subtilis* 168 WT (дикий тип). Штамм *Bacillus subtilis* 8G5 $\Delta degS \Delta degU$ (*degS*, *degU*; Km^r), мутантный по генам *degS* и *degU* предоставлен для работы доктором Jan Maarten van Dijk, университет Гронингена, Голландия; штамм *B. subtilis* WM90 ($\Delta spo0A$; Km^r), дефектный по регуляторному белку Spo0A предоставлен проф. Вилфридом Мейером, Мадрид, Испания. Протеазодефицитный штамм *B. subtilis* BG2036 предоставлен для работы проф. С.В. Костровым, Институт молекулярной генетики РАН, Москва.

Плазмида pCS9 с клонированным полным геном субтилизиноподобной протеиназы (*aprBp*) и вектор $\Delta 58.21$ содержащий полный ген глутамилэндопептидазы (*gseBp*), предоставлены для работы проф. С.В. Костровым. Плазмида pMF14, несущая С-концевой домен белка Spo0A с олигопептидом (His)₆ на N-конце, предоставлена для работы проф. Ричардом Лозиком (Гарвардский Университет, Кэмбридж, Англия); плазмида pAC6 предоставлена для работы проф. Й.Штульке (Университет Фридрих-Александр, Эрланген, Германия). Экспрессионные векторы pET30-*degU* и pET-*degS* несущие гены белков DegU и DegS, соответственно, предоставлены для работы профессором К.Цукахару (Институт океанических исследований и развития, Токио, Япония). В качестве штамма-реципиента экспрессионных векторов использовали штамм *E. coli* BL21, предоставленный для работы проф. К.Форшхаммером (Университет г. Тюбинген, Германия).

Культивирование штаммов осуществляли на среде Лурия Бертани (LB) (%): триптон – 1.0, дрожжевой экстракт – 0.5, NaCl – 0.5; pH 8.5 (Sambrook et al., 1989). Агаризованная среда содержала дополнительно 2% агара. Среды для трансформации штаммов *B. subtilis* включали солевую основу среды Спицизена (Anagnostopoulous, Spizizen, 1961). Среды стерилизовали при 1 атм. в течение 30 мин, pH доводили перед стерилизацией среды 40%-ным раствором NaOH до значения 8.5. При выращивании рекомбинантных штаммов в среду вносили соответствующие антибиотики в конечной концентрации (мкг/мл): ампициллин – 100, хлорамфеникол – 25, канамицин – 50.

Определение протеолитической активности. Специфическую протеолитическую активность субтилизиноподобной протеиназы и глутамилэндопептидазы определяли по расщеплению специфических хромогенных субстратов Z-Ala-Ala-Leu-pNa и Z-Glu-pNa соответственно (Люблинская с соавт., 1987).

Методы анализа с применением радиоактивной метки. Транскрипцию *in vitro* проводили с амплифицированных участков ДНК, содержащих регуляторную и структурную области генов *aprBp* и *gseBp*. К реакционной смеси, содержащей ДНК, РНК-полимеразу и 4 рибонуклеотидтрифосфата добавляли 0.5мкКи [³²P]УТР и 20 мкг гепарина и инкубировали 10 мин. Реакцию останавливали стоп-буфером (раствор формамида с бромфеноловым синим). Полученные транскрипты мРНК анализировали в денатурирующем 7% ПААГ с последующей радиоавтографией.

Для реакции удлинения праймера выделяли тотальную РНК из клеток *B. pumilus*, обратно-транскрибировали с 100 ед. «Super Script III enzyme» (Invitrogen, США) в присутствии 1пмоль [³²P] меченного праймера, комплементарного последовательности нуклеотидов в позициях 96-120 гена *aprBp* и 111-134 гена *gseBp*. Реакцию удлинения праймера проводили в течение 50 мин при 50°C и останавливали инкубацией при 85°C в течении 5 мин. РНК удаляли при обработке РНКазой Н. Продукты реакции обрабатывали хлороформом, осаждали с помощью этанола и ресуспендировали в буфере для нанесения. Для секвенирующей реакции использовали тот же меченый праймер. Реакцию секвенирования проводили, используя коммерческий набор «*fmol* DNA Cycle Sequencing System» (Promega, США). Продукты реакции анализировали в 6% денатурирующем ПААГ с последующей радиоавтографией.

ДНК-белковое взаимодействие. Для реакции взаимодействия использовали белки DegU, DegS и Spo0A, очищенные методом аффинной хроматографии на колонке с Ni-NTA и амплификаты регуляторных областей генов *aprBp* и *gseBp* с соответствующими контрольными последовательностями. Для амплификации ДНК использовали FAM-меченные праймеры. Очистку амплифицированной ДНК проводили с помощью наборов реактивов фирмы «Fermentas» (Латвия). Фосфорилирование белка DegU проводили, как описано в работе (Gueriri et al., 2008). Для реакции связывания, смешивали 500 нг ДНК с соответствующим белком в концентрации от 0 (свободная ДНК) до 1000 нг. В каждую пробу в качестве неспецифической ДНК добавляли 1 мкг тотальной ДНК спермы лосося. Пробу инкубировали в течение 20 мин при 37°C и наносили на 6% ПААГ. Гели визуализировали с помощью флуорометра «Typhoon 8600» (Amersham Biosciences, США).

Получение рекомбинантных конструкций. Процедуры по получению рекомбинантной плазмидной ДНК проводили в клетках *E. coli*, как описано в (Sambrook et al., 1989). Праймеры конструировали с помощью программного обеспечения SnapGene (GSL Biotech LLC, США) на основании последовательностей промотора *aprBp* (AN AY754946.2). Синтез праймеров и секвенирование ДНК проводили в фирме «Синтол» (Москва).

Для получения рекомбинантных конструкций оптимизировали потенциальные участки связывания с белком DegU~P в промоторе гена *aprBp* (сайт 1 и сайт 2). Оптимизированные промоторы, полученные с помощью ПЦР-реакции, а также исходный промотор, клонировали в вектор pAC6 с образованием плазмид pAM4 (контроль), pAM41 (сайт 1) и pAM42 (сайт 2). Экспрессию репортерного белка под контролем модифицированных промоторов оценивали методом Миллера, по расщеплению β -галактозидазой хромогенного субстрата ONPG (Miller, 1972). Активность модифицированных промоторов на уровне транскрипции определяли методом ПЦР «в режиме реального времени». Уровень мРНК определяли методом Ливака (Livak, 2001) по значениям порогового цикла с учетом того, что концентрация целевых фрагментов ДНК увеличивалась как 2^N , где N - количество циклов.

Секвенирование и геноинформатика. Анализ нуклеотидных последовательностей проводили с помощью программного пакета Vector NTI 8.0 (Life Technologies, США). Выравнивание последовательностей проводили с помощью online программного обеспечения NCBI/BLAST.

Математическая обработка результатов. Для статистического анализа данных использовали программу Microsoft Excel (Microsoft, США). Для описания и сравнения признаков использовали построения 95%-ных доверительных интервалов для средних значений.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Динамика роста и накопления протеолитической активности сериновых протеиназ в регуляторных мутантах

Бактерии секретируют в среду различные протеолитические ферменты, преимущественно в стационарной фазе роста при недостатке питательных веществ. В большинстве случаев такие ферменты выполняют трофическую функцию для клетки, превращая труднодоступные субстраты в легко утилизируемые соединения.

Исследовали динамику роста и накопления сериновых протеиназ *B. pumilus* – субтилизиноподобной протеиназы и глутамилэндопептидазы в культуральной жидкости рекомбинантного штамма. Плазмиды с клонированными генами ферментов трансформировали в реципиентные протеазодефицитные штаммы *B. subtilis*. На рисунке 1А представлены данные для субтилизиноподобной протеиназы. Максимальное накопление фермента в среде наблюдали на 30-32 и 48-50 ч роста, соответственно. Данные по динамике роста и накоплению глутамилэндопептидазы в культуральной жидкости рекомбинантного штамма показали максимальную активность фермента на 22 и 46 ч роста (рисунок 1Б).

Экспрессия поздних генов бацилл характеризуется множественной регуляцией, т.е. контроль экспрессии осуществляют различные регуляторные белки, формируя сигнальную сеть для интегрированного ответа на изменения в среде. В этот период роста у бацилл активируются системы регуляции Spo0A-фосфопередачи и двухкомпонентная система DegS-DegU, которые запускают

транскрипцию генов многих белков, включая гены сериновых протеиназ (Veening et al, 2008).

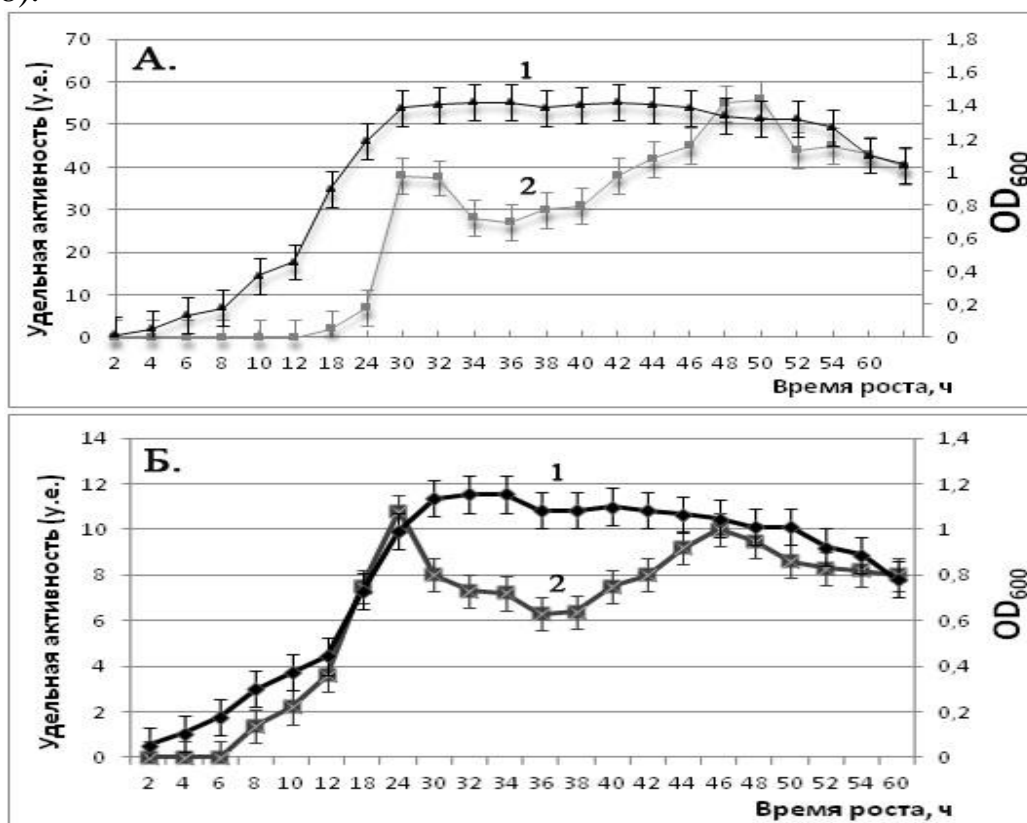


Рисунок 1 –Рост (1) и уровень активности (2) субтилизиноподобной протеиназы и глутамилэндопептидазы рекомбинантных штаммов, несущих плазмиды pCS9 с полным геном субтилизиноподобной протеиназы (А) и Δ58.21 с полным геном глутамилэндопептидазы (Б).

Для оценки влияния *in vivo* регуляторных белков Spo0A и DegU на экспрессию генов субтилизиноподобной протеиназы и глутамилэндопептидазы, исследовали изменение накопления ферментов в культуральной жидкости рекомбинантных штаммов с полноценными генами регуляторных белков и тех же штаммов с инактивированными генами регуляторных белков. Плазмиды, несущие ген субтилизиноподобной протеиназы (pCS9), либо глутамилэндопептидазы (Δ58.21) под собственным промотором, были трансформированы в регуляторные мутанты и соответствующие исходные штаммы.

Сравнительное определение активности субтилизиноподобной протеиназы проводили в культуральной жидкости исходных и мутантных штаммов на 30 и 48 ч роста, соответственно. На 30 ч роста удельная активность субтилизиноподобной протеиназы в диком штамме в 3.2 раза превышала уровень протеолитической активности в мутантном штамме, дефектном по системе регуляции DegS-DegU (Таблица 1). На 48 ч роста активность в исходном штамме в 3.9 раз превышала таковую в мутантном штамме. Полученные данные свидетельствуют о влиянии системы DegS-DegU на экспрессию гена субтилизиноподобной протеиназы.

Исследовали экспрессию гена субтилизиноподобной протеиназы в штамме, дефектном по Spo0A-системе фосфопередачи (Таблица 2). На 30 ч роста удельная активность субтилизиноподобной протеиназы в контрольном штамме была в 4.1 раза выше, чем в мутантном штамме. На 48 ч роста активность в контрольном

штамме в 15 раз превышала активность в мутантном штамме. Полученные данные свидетельствовали о влиянии регуляторного белка Spo0A на экспрессию гена субтилизиноподобной протеиназы.

Далее исследовали влияние DegU- и Spo0A- систем регуляции на экспрессию гена глутамилэндопептидазы в системе *in vivo* с использованием регуляторных мутантов. Определение активности глутамилэндопептидазы *B. pumilus* в рекомбинантных штаммах проводили, исходя из данных, полученных при анализе накопления фермента во внеклеточной среде в диком штамме, на 22 и 46 ч роста культуры, соответственно. На 22 ч роста удельная активность глутамилэндопептидазы в штамме с полноценной регуляторной системой DegS/U была в 1.5 раза выше, чем в мутантном штамме (Таблица 1). На 46 ч роста удельная активность в полноценном штамме и в регуляторном мутанте практически не отличалась. Полученные данные указывали на частичное подавление активности фермента в отсутствие функционально-активной системы DegS-DegU.

Исследовали экспрессию гена глутамилэндопептидазы *B. pumilus* в рекомбинантном штамме с делетированным геном регуляторного фактора Spo0A. На 22 ч роста удельная активность глутамилэндопептидазы контрольного штамма с полноценной системой регуляции была выше в 1.2 раза, а на 46 ч активность в исходном штамме была в 2 раза выше активности в регуляторном мутанте, что указывало на позитивное влияние транскрипционного фактора Spo0A на экспрессию гена глутамилэндопептидазы.

Таблица 1 - Удельная активность сериновых протеиназ в исходном и мутантном штаммах с делетированной системой DegS-DegU.

Штаммы	Субтилизиноподобная протеиназа		Глутамилэндопептидаза	
	30 ч	48 ч	22 ч	46 ч
Исходный штамм	37.5±0.8 у.е.	42.5±0.9 у.е.	6.3±0.2 у.е.	5.9±0.2 у.е.
ΔDegS/U	11.5±0.4 у.е.	10.75±0.4 у.е.	4.0±0.2 у.е.	5.8±0.2 у.е.

Таблица 2 - Удельная активность сериновых протеиназ в исходном и мутантном штаммах с делетированным регуляторным белком Spo0A

Штаммы	Субтилизиноподобная протеиназа		Глутамилэндопептидаза	
	30 ч	48 ч	22 ч	46 ч
Исходный штамм	29±0.8 у.е.	60±1 у.е.	7.1±0.3 у.е.	6.3±0.2 у.е.
ΔSpo0A	7±0.3 у.е.	4±0.2 у.е.	5.9±0.2 у.е.	3.2±0.3 у.е.

Таким образом, полученные данные показали, что регуляторные системы DegS-DegU и Spo0A-фосфопередачи влияют на экспрессию генов сериновых протеиназ - субтилизиноподобной протеиназы и глутамилэндопептидазы.

2. Аннотация промоторных участков генов субтилизиноподобной протеиназы и глутамилэндопептидазы

Проводили аннотацию промоторных участков генов сериновых протеиназ *B. pumilus* с целью поиска сайтов взаимодействия промоторов этих генов с регуляторными белками Spo0A и DegU~P. Знания о локализации потенциальных регуляторных сайтов в промоторах необходимы для проведения гель-шифт экспериментов с промоторами генов.

По данным литературы, нуклеотидная последовательность, распознаваемая белком Spo0A в промоторах – TGNCGAA (Molle et al., 2003; Liu et al., 2003). Для фосфорилированной формы белка DegU~P такой последовательностью является тандем из прямых повторов GNCATTTAn(n)GNCATTTA (Ogura, Tsukahara, 2010). Нефосфорилированная форма белка DegU узнает другую последовательность GTCATTTA-N7-TAAATATC (Ogura, Tsukahara, 2010). В результате анализа промоторной области гена субтилизиноподобной протеиназы идентифицировали 3 потенциальных сайта связывания с белком Spo0A и два потенциальных сайта связывания с фосфорилированным белком DegU~P (рисунок 2А). Степень гомологии к консенсусной последовательности: составила 80% для сайтов связывания с белком Spo0A и 71% для сайтов связывания с белком DegU~P.

В промоторной области гена глутамилэндопептидазы идентифицировали 2 потенциальных сайта для взаимодействия со Spo0A фактором транскрипции и один сайт для взаимодействия с DegU~P фактором транскрипции (рисунок 2Б) и определили степень их гомологии с консенсусными последовательностями, которая составила 65 и 72%, соответственно.

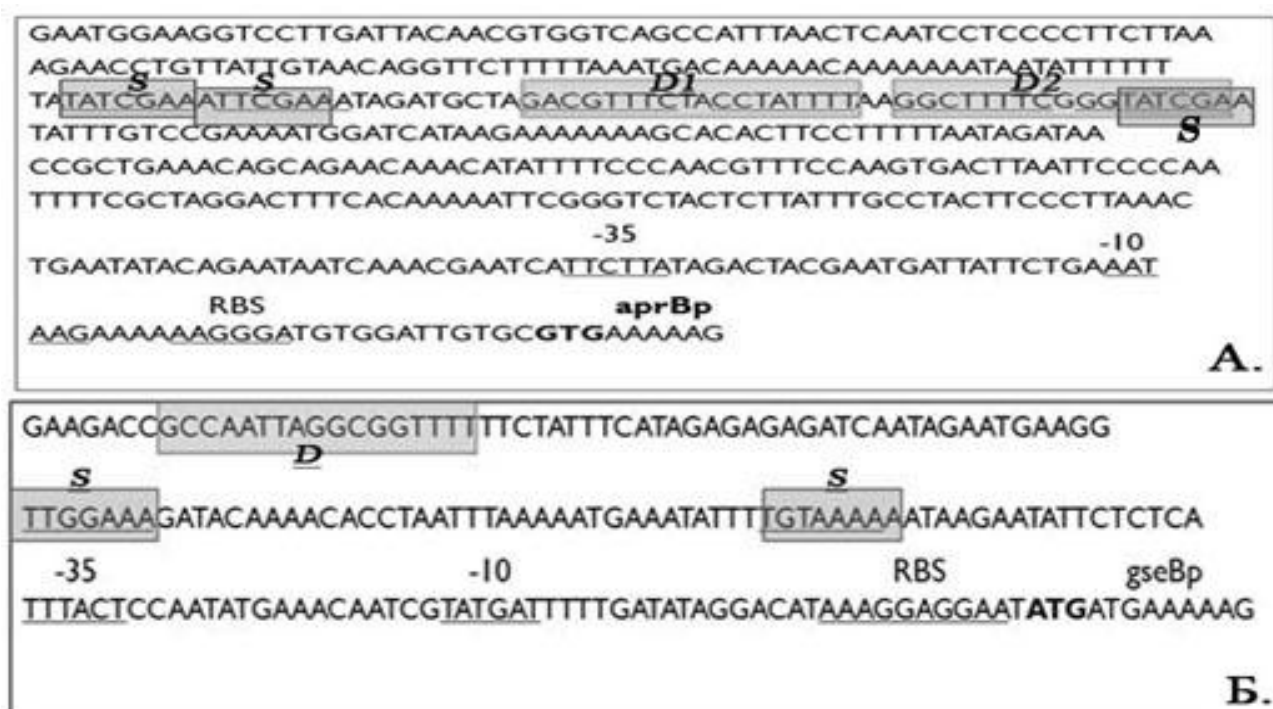


Рисунок 2 – Нуклеотидная последовательность промоторных областей генов субтилизиноподобной протеиназы (А) и глутамилэндопептидазы (Б) *B. pumilus*. Spo0A-сайты выделены рамкой и отмечены символом «S», DegU~P сайты выделены рамкой и обозначены символом «D» и цифрами «1» и «2», гипотетические -10, -35 области и последовательность Шайна-Дальгарно (RBS) подчеркнуты, старт-кодон выделен полужирным.

Данные геноинформационного анализа указывали на влияние регуляторных белков Sro0A и DegU~P на экспрессию генов субтилизиноподобной протеиназы и глутамилэндопептидазы.

3. Определение направления и стартовых точек транскрипции генов сериновых протеиназ *B. pumilus* в системе *in vitro*

Для картирования промоторов субтилизиноподобной протеиназы и глутамилэндопептидазы *in vitro*, провели эксперименты по определению направления транскрипции и точки начала транскрипции генов субтилизиноподобной протеиназы (*aprBp*) и глутамилэндопептидазы (*gseBp*). Картирование промоторных областей *in vitro* необходимо для выяснения структуры промотора, расположения его основных элементов и понимания процесса запуска транскрипции гена.

Для инициации транскрипции ДНК, РНК-полимераза накрывает область гена протяженностью до 60 нуклеотидов, от -40 до +20 (Cooper, 2000). Для проведения транскрипции *in vitro* гена субтилизиноподобной протеиназы амплифицировали участки ДНК от -145 до +290, и от -145 до +200, и гена глутамилэндопептидазы участки ДНК от -132 до +134, и от -132 до +224. Амплификаты проинкубировали с РНК-полимеразой, которая при синтезе мРНК включала в цепь меченый уридинтрифосфат. Полученные транскрипты мРНК экспонировали с помощью рентгеновской пленки (рисунок 3).

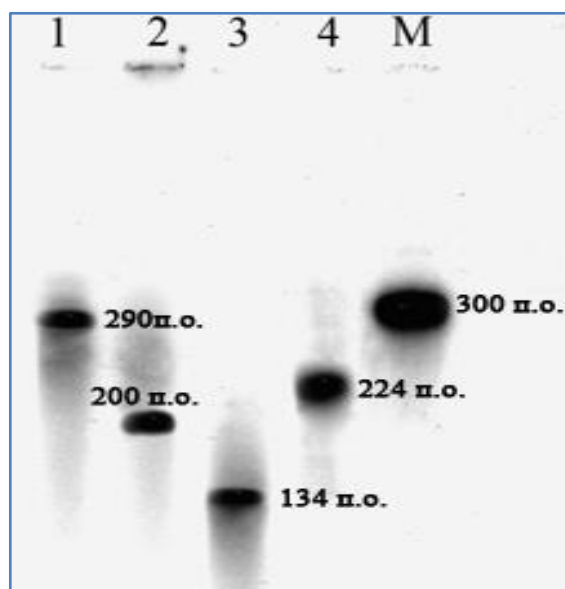


Рисунок 3 – Авторадиография транскрибированных *in vitro* мРНК генов субтилизиноподобной протеиназы (дорожки 1-2) и глутамилэндопептидазы (дорожки 3-4). М – маркер молекулярного веса.

На дорожках 1 и 2 изображены мРНК, синтезированные с фрагментов гена *aprBp*. Размер транскриптов соответствовал предполагаемому размеру в 290 и 200 п.о. соответственно. На дорожках 3 и 4 изображены фрагменты мРНК гена *gseBp* размером 134 п.о. и 224 п.о., что также соответствовало предполагаемым размерам транскриптов. Таким образом, было установлено, что транскрипция

идет в смысловом направлении ($5' \rightarrow 3'$), предсказанном методами биоинформационного анализа ДНК.

Далее идентифицировали стартовые точки транскрипции обоих генов *aprBp* и *gseBp* *in vitro* методом удлинения праймера.

Была выделена тотальная РНК культуры *B. pumilus*. С помощью отжига меченого праймера на 5' конец мРНК и добавлением обратной транскриптазы получили целевую кДНК. Реакцию разделения кДНК в геле проводили одновременно с секвенирующей реакцией по Сэнгеру (Sanger, 1975). Размер кДНК соответствовал на геле определенному нуклеотиду, с которого начиналась транскрипция. Этот нуклеотид представлял +1 область в промоторе гена (рисунок 4).

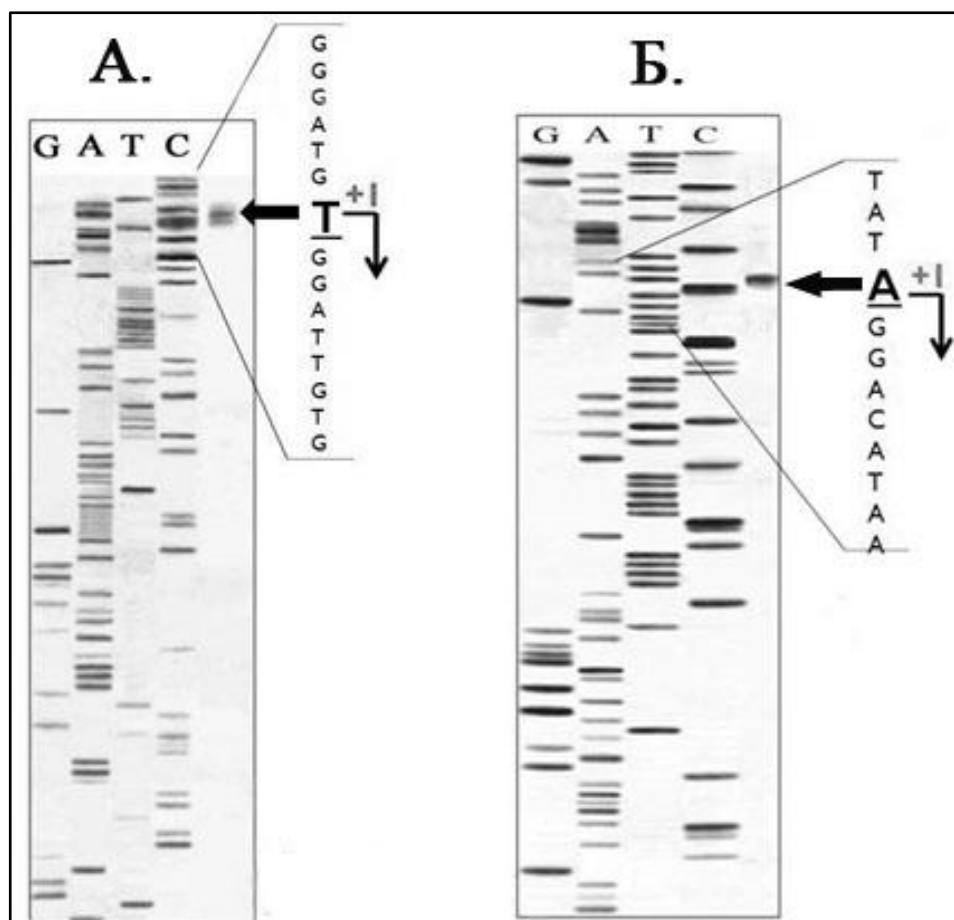


Рисунок 4 – Авторадиография фрагментов кДНК промоторов генов субтилизиноподобной протеиназы (А) и глутамилэндопептидазы (Б). Стрелкой указаны целевые фрагменты кДНК, соответствующие +1 точке.

У гена субтилизиноподобной протеиназы был выявлен единственный продукт реакции элонгации, которому соответствует нуклеотид тимин в реакции секвенирования. Тимин являлся точкой старта транскрипции гена субтилизиноподобной протеиназы. У гена глутамилэндопептидазы был выявлен также единственный продукт транскрипции. Его размер соответствовал нуклеотиду тимину по цепи в $3' \rightarrow 5'$ направлении, следовательно, стартовой точкой транскрипции являлся комплементарный ему нуклеотид аденин.

По данным литературы, транскрипционная активность генов бактерий осуществляется как транс-элементами (регуляторными факторами), так и цис-. Такой способ регуляции осуществляется посредством транскрипционной интерференции. Под термином «транскрипционная интерференция» понимается прямое негативное влияние одной транскрипционной активности на другую. Транскрипционная интерференция является результатом сосуществования двух промоторов: сильный (агрессивный) промотор снижает экспрессию слабого (чувствительного) промотора (Callen et al., 2004). На рисунке 4 продемонстрированы транскрипты в виде одной полосы, что указывало на инициацию транскрипции с единственного промотора для генов обоих ферментов и свидетельствовало о цис-регуляции генов. Таким образом, локализовали основные промоторные элементы генов *aprBp* и *gseBp*.

4. Взаимодействие промоторных ДНК генов *aprBp* и *gseBp* с транскрипционными факторами DegU~P и Spo0A

Факторы транскрипции Spo0A и DegU~P являются регуляторами, которые активируются в постэкспоненциальной фазе роста бактерий. Обнаружение потенциальных сайтов связывания с факторами Spo0A и DegU~P в промоторах позволило предположить их участие в контроле экспрессии генов субтилизиноподобной протеиназы и глутамилэндопептидазы, которые секретируются в среду в стационарной фазе.

Гель-шифт анализ (EMSA) позволяет определить взаимодействие между ДНК генов и белковыми факторами транскрипции. Для осуществления гель-шифт анализа получали ПЦР-фрагменты ДНК промоторов генов бактериальных протеиназ, а также генов, используемых в качестве положительного и отрицательного контролей при постановке эксперимента, для которых установлено взаимодействие с этими факторами транскрипции (Molle, 2003; Shimane and Ogura, 2004) (рисунок 5).

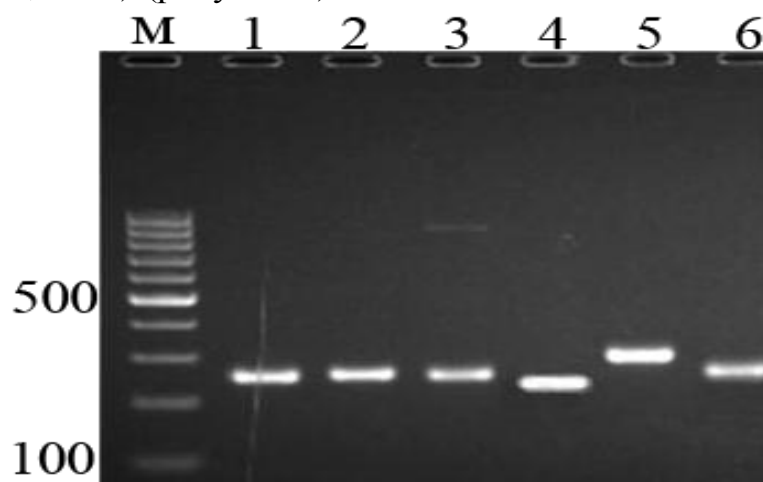


Рисунок 5 – ПЦР-амплификация промоторных участков ДНК для постановки гель-шифт-анализа. 1- ген *abrB* («+» контроль для Spo0A), 2 – ген *citG* («-» контроль для Spo0A), 3 – ген *comK* («-» контроль для DegU~P), 4 – ген *aprE* («+» контроль для DegU~P), 5 – ген *aprBp* (ген субтилизиноподобной протеиназы), 6 – ген *gseBp* (ген глутамилэндопептидазы).

Получали очищенные факторы транскрипции DegU, DegS и Spo0A. Для этого использовали соответствующие штаммы-продуценты. Экспрессионными векторами pET-DegU, pET-DegS и pMF14, несущими гены *degU* и *degS* и клонированный ген С-концевого домена белка Spo0A, трансформировали штамм *E. coli* BL21. Для белка Spo0A показано, что его редуцированная форма, состоящая только из ДНК-связывающего С-концевого домена способна связывать ДНК, вне зависимости от состояния фосфорилирования (Molle et al., 2003).

Получили рекомбинантные штаммы, способные обеспечить гиперэкспрессию рекомбинантных белков DegS, DegU и Spo0A, несущих His-tag на N-конце, что позволило провести очистку белков с помощью металл-хелатной аффинной хроматографии.

Очистку регуляторных белков проводили на Ni-NTA колонке (Sigma, США). Для элюции белка использовали имидазол, т.к. он является конкурентом гистидина за взаимодействие с ионами Ni и способен вытеснять его из хелатных комплексов.

Элюат собирали фракциями и анализировали с помощью электрофореза в SDS-ПААГ (рисунок 6). Белковые фракции объединяли и концентрировали с помощью полупроницаемой мембраны и полиэтиленгликоля (ПЭГ) и определяли концентрацию белка спектрофотометрически.

Как видно из данных на рисунке 6, молекулярная масса регуляторных белков на электрофорезе соответствовала их действительной массе и составила 26 кДа (DegU), 43 кДа (DegS) и 14 кДа (Spo0A).

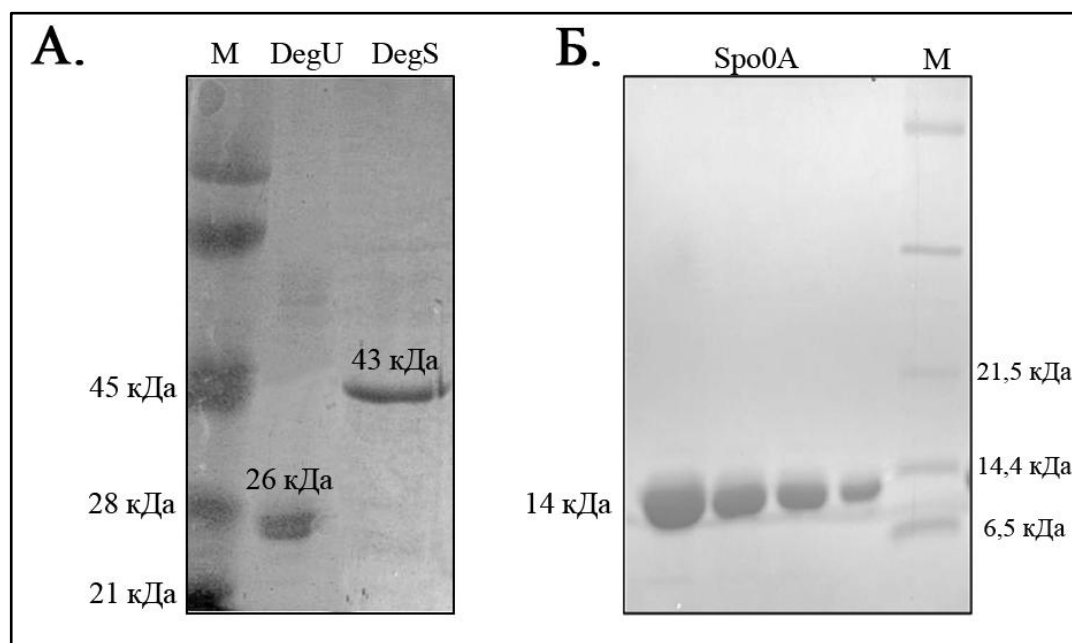


Рисунок 6 – SDS-ПААГ электрофорез очищенных регуляторных белков. А - белки DegU и DegS. Б – белок Spo0A.

Таким образом, в результате очистки клеточных экстрактов *E. coli* BL21 с соответствующими плазмидами, получили регуляторные белки DegU, DegS и Spo0A, в количестве, достаточном для проведения гель-шифт экспериментов.

На следующем этапе проводили реакцию фосфорилирования белка DegU при помощи гистидинкиназы DegS и ATP *in vitro*, т.к. нефосфорилированная форма DegU белка участвует в контроле состояния компетентности.

Для постановки эксперимента использовали [32 P]ATP. Для установления автофосфорилирования белка DegS инкубировали белок в буфере с добавлением [32 P]ATP. Для фосфорилирования DegU, белок DegS добавляли к смеси и инкубировали в течение 2, 10 и 30 мин (рисунок 7).

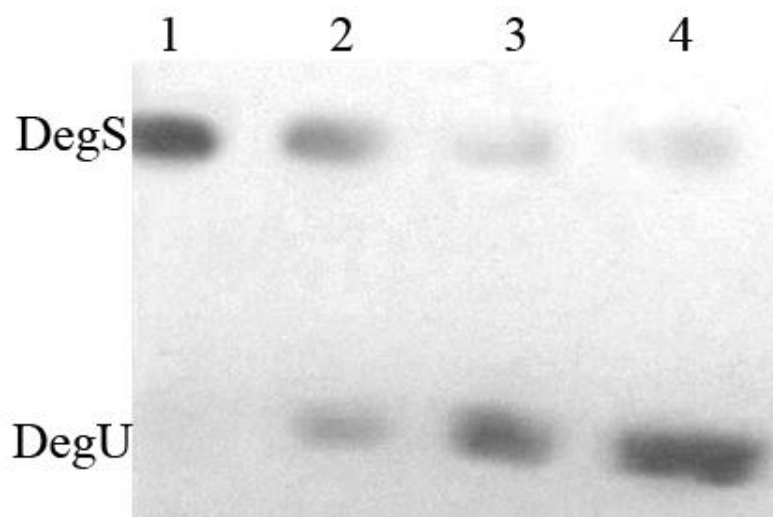


Рисунок 7 – Авторадиография фосфорилирования белка DegU с помощью гистидинкиназы DegS и [32 P]ATP. 1 - автофосфорилирование DegS. Инкубация с [32 P]ATP 30 мин, 2 - фосфорилирование DegU. Инкубация DegS и DegU - 2 мин, 3 - Инкубация DegS и DegU - 10 мин, 4 - Инкубация DegS и DegU - 30 мин.

Как видно из рисунка, гистидинкиназа автофосфорилируется с течением времени и передает фосфатную группу на белок регулятор – DegU, который переходит в фосфорилированную форму.

Таким образом, получили фосфорилированную форму белка DegU, необходимую для проведения гель-шифт анализов с промоторами генов сериновых протеиназ *B. pumilus*.

Для определения взаимодействия факторов транскрипции Spo0A и DegU~P с промоторными областями генов *aprBp* и *gseBp* и для определения условий эксперимента проводили гель-шифт анализ с контрольными промоторами.

Концентрация меченой ДНК составляла 500 нг на реакцию, концентрация белков Spo0A и DegU~P – от 0 до 1000 нг на реакцию. Результаты представлены на рисунке 8.

По данным на рисунке 8, при взаимодействии с положительными контрольными промоторами, наблюдали образование ДНК-белковых комплексов, которые движутся в геле медленнее, чем свободная ДНК. В реакционной смеси с отрицательными контрольными участками ДНК, таких взаимодействий между белками и контрольной ДНК не наблюдали.

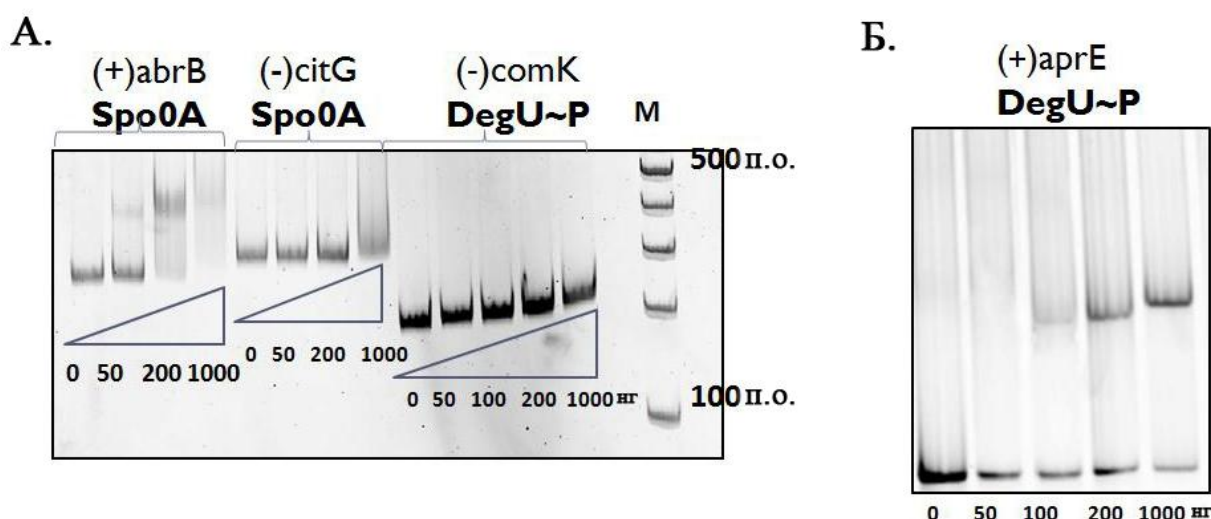


Рисунок 8 – ДНК-белковое взаимодействие контрольных промоторов с белками Spo0A и DegU~P. А – взаимодействие белка Spo0A с положительным контролем *abrB* и отрицательным контролем *citG* и взаимодействие белка DegU~P со своим отрицательным контролем *comK*. Б – взаимодействие белка DegU~P с положительным контролем *aprE*.

Данные гель-шифт анализа с контрольными фрагментами ДНК позволили определить условия для проведения анализа ДНК-белковых взаимодействий с промоторами генов субтилизиноподобной протеиназы и глутамилэндопептидазы (рисунки 9-10).

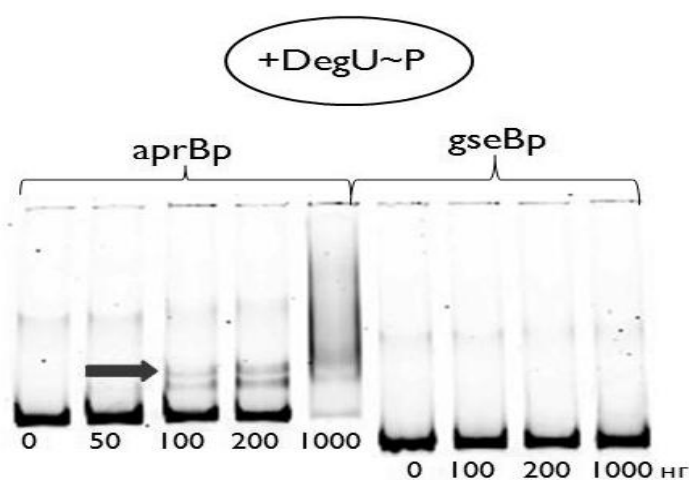


Рисунок 9 – ДНК-белковое взаимодействие белка DegU~P с промоторами субтилизиноподобной протеиназы и глутамилэндопептидазы. Стрелкой показано образование ДНК-белковых комплексов.

Как следует из данных рисунка 9, образование ДНК-белковых комплексов наблюдали в случае взаимодействия с геном *aprBp*. Эксперимент с промотором гена *gseBp* не показал дополнительных полос задержки в геле. Сделали заключение, что белок DegU~P связывался с промотором гена субтилизиноподобной протеиназы и не взаимодействовал с промотором гена глутамилэндопептидазы.

Проводили эксперименты по формированию ДНК-белковых комплексов между теми же участками ДНК и белком Spo0A. Как следует из данных рисунка 10, белковый фактор Spo0A связывался с промоторами генов обоих сериновых

протеиназ, что указывало на регуляцию экспрессии этих генов со стороны данного фактора транскрипции.

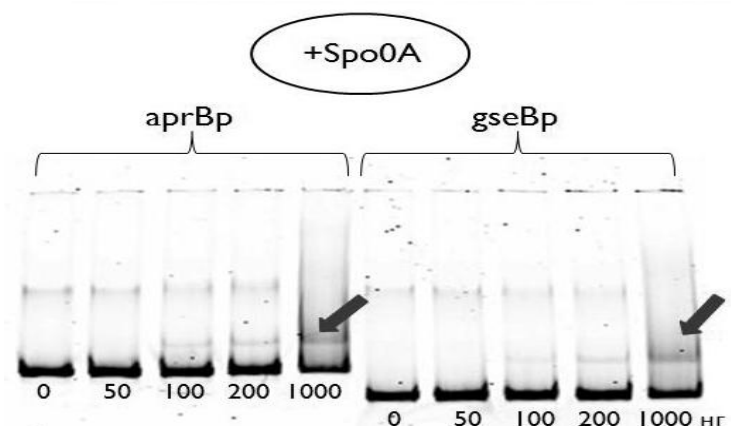


Рисунок 10 - ДНК-белковое взаимодействие белка Spo0A с промоторами субтилизиноподобной протеиназы и глутамилэндопептидазы. Стрелкой показано образование ДНК-белковых комплексов.

Полученные нами данные *in vitro* по связыванию Spo0A-фактора транскрипции подтвердили данные экспериментов на регуляторных мутантах *B. subtilis* об участии системы Spo0A-фосфопередачи в регуляции экспрессии генов обоих ферментов. Эти результаты позволили отнести гены сериновых протеиназ *B. pumilus* к членам Spo0A-регулона.

К членам DegU-регулона можно отнести только ген субтилизиноподобной протеиназы *B. pumilus*, т.к. фосфорилированная форма транскрипционного фактора не взаимодействовала с *gseBp*-промотором. Тем не менее, экспрессия *gseBp* в Δ DegS/U мутантах привела к частичному снижению экспрессии гена *gseBp*. Эти данные свидетельствовали об опосредованном влиянии транскрипционного фактора DegU на экспрессию гена глутамилэндопептидазы.

По совокупности полученных данных мы установили различия в организации промоторов и молекулярных механизмах регуляции генов *aprBp* и *gseBp*, что отражалось на уровне экспрессии. Ген *aprBp* дает больше продукта, который доминирует в пуле внеклеточных протеиназ, тогда как продукт гена *gseBp* от тотальной внеклеточной протеолитической активности составляет в максимально индуцируемых условиях не более 10% (Балабан с соавт., 2013).

Таким образом, на основе ДНК-белковых взаимодействий между промоторами генов сериновых протеиназ *B. pumilus* и факторами транскрипции показано, что обе протеиназы (AprBp и GseBp) различаются по механизму контроля. Промотор гена доминирующей протеиназы AprBp имеет большее количество ДНК-связывающих сайтов для регуляторных белков по сравнению с промотором гена минорной протеазы GseBp. Такая структура промоторов соответствует функциям этих ферментов в клетках *B. pumilus*. В условиях лимитации питательных веществ, клетка секретирует глутамилэндопептидазу (максимум активности приходится на 22 ч роста), которая гидролизует в субстратах связи, образованные остатками глутаминовой и аспарагиновой аминокислот. По мере роста бактерий активность глутамилэндопептидазы

снижается, и нарастает активность доминирующей субтилизиноподобной протеиназы (30 ч роста), которая неспецифически расщепляет белковые субстраты, в том числе и олигопептиды, образованные при гидролизе глутамилэндопептидазой. Оба фермента при гидролизе дополняют друг друга, что ведет к более глубокому гидролизу субстратов. По-видимому, такой механизм последовательной секреции ферментов (последовательной экспрессии генов) в зависимости от стадии развития культуры отражает разную, но регуляторно координированную организацию промоторных регионов генов протеиназ.

5. Модификация сайта взаимодействия с регуляторным белком DegU~P в промоторе гена субтилизиноподобной протеиназы

Сайты взаимодействия с транскрипционным фактором DegU~P в промоторе гена *aprBp* модифицировали до полной гомологии с консенсусной последовательностью GNCATTTAnnGNCATTTA. Изменения в ДНК вносили методом двухстадийной ПЦР (рисунок 11).

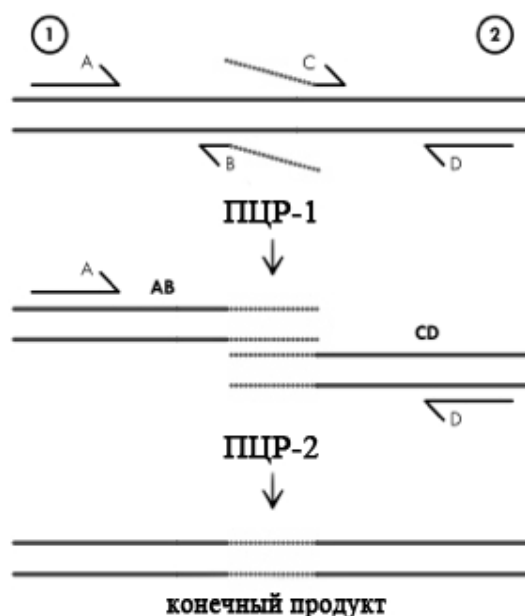


Рисунок 11 – Схема модификации промотора гена субтилизиноподобной протеиназы с помощью двухстадийной ПЦР (описание в тексте).

Мутации вводили в частично комплементарные друг другу праймеры В и С. Первые реакции осуществляли с двух пар праймеров А + В и С + D, полученные амплификаты АВ и CD очищали и использовали в качестве матрицы для постановки второй реакции амплификации. Вторую реакцию проводили с использованием концевых праймеров А + D. Промоторы с неизменной последовательностью получали одностадийной ПЦР с использованием праймеров А + D. В итоге по этой схеме мы получили три варианта промоторной области ДНК гена *aprBp B. pumilus* – контрольный исходный промотор, промотор с измененным первым сайтом взаимодействия с фактором транскрипции и промотор с измененным вторым сайтом взаимодействия с DegU~P в гене субтилизиноподобной протеиназы *B. pumilus*.

Все три фрагмента промоторной ДНК клонировали в плазмидный шаттл-вектор pAC6 (Stulke et al., 1997) (рисунок 12), предназначенный для трансформации в бациллы. Выбор вектора определялся содержанием в нем репортерного белка гена *lacZ* с сайтом для гетерологичной вставки различных промоторных конструкций для изучения экспрессии под их управлением.

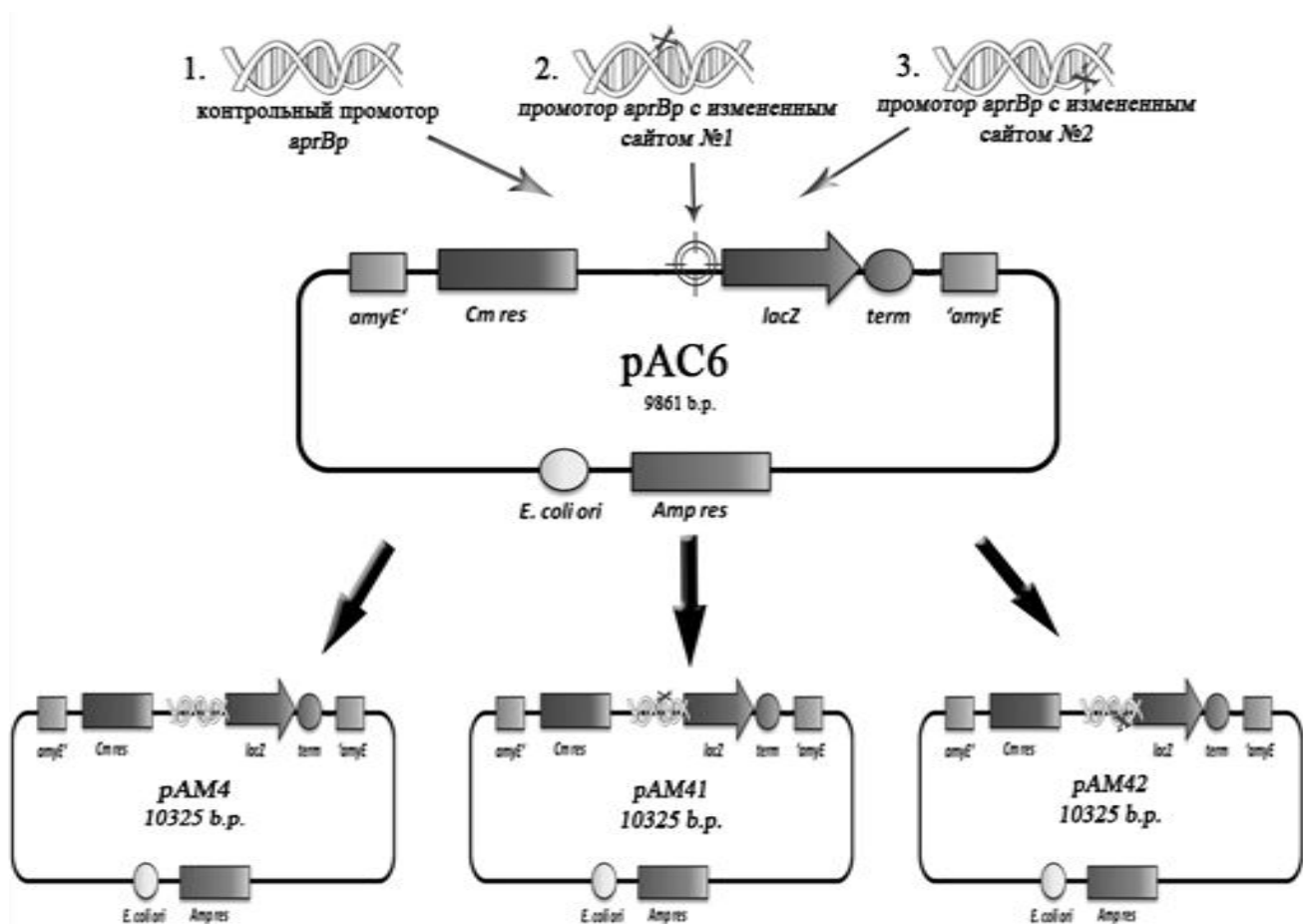


Рисунок 12 – Схема клонирования промоторных областей *aprBp* в вектор pAC6 (описание в тексте).

Получили три рекомбинантные векторные молекулы, различающиеся по структуре сайтов взаимодействия с фосфорилированным белком DegU~P: pAM4 (контрольный промотор без модификаций), pAM41 (промотор с модифицированным сайтом 1) и pAM42 (промотор с модифицированным сайтом 2). Присутствие модификаций в промоторе подтверждали секвенированием.

Наличие вставок в векторах устанавливали с помощью ПЦР с колоний рекомбинантных штаммов *E. coli* (рисунок 13). Прямой праймер был комплементарен векторной молекуле, обратный праймер - промоторной области. Размер ПЦР-продукта соответствовал 725 п.о.

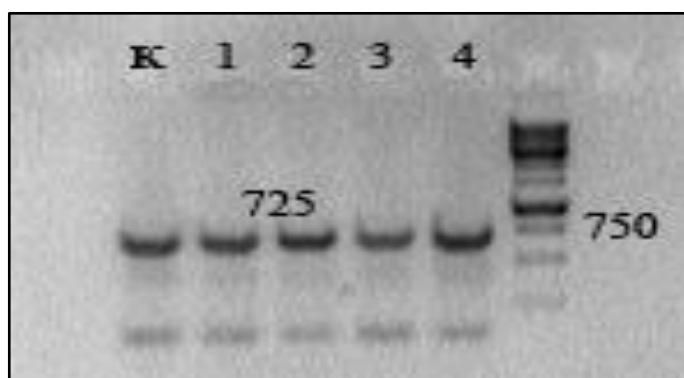


Рисунок 13 – ПЦР с колоний рекомбинантных штаммов *E. coli*, трансформированных тремя конструкциями: К- штамм с плазмидой рАМ4; 1-2 – штаммы с плазмидой рАМ41; 3-4 штаммы с плазмидой рАМ42.

На следующем этапе рекомбинантные плазмиды трансформировали в дикий штамм *B. subtilis* 168. Изучали динамику роста (рисунок 14А) и накопление β -галактозидазной активности в клетках рекомбинантных штаммов (рисунок 14Б).

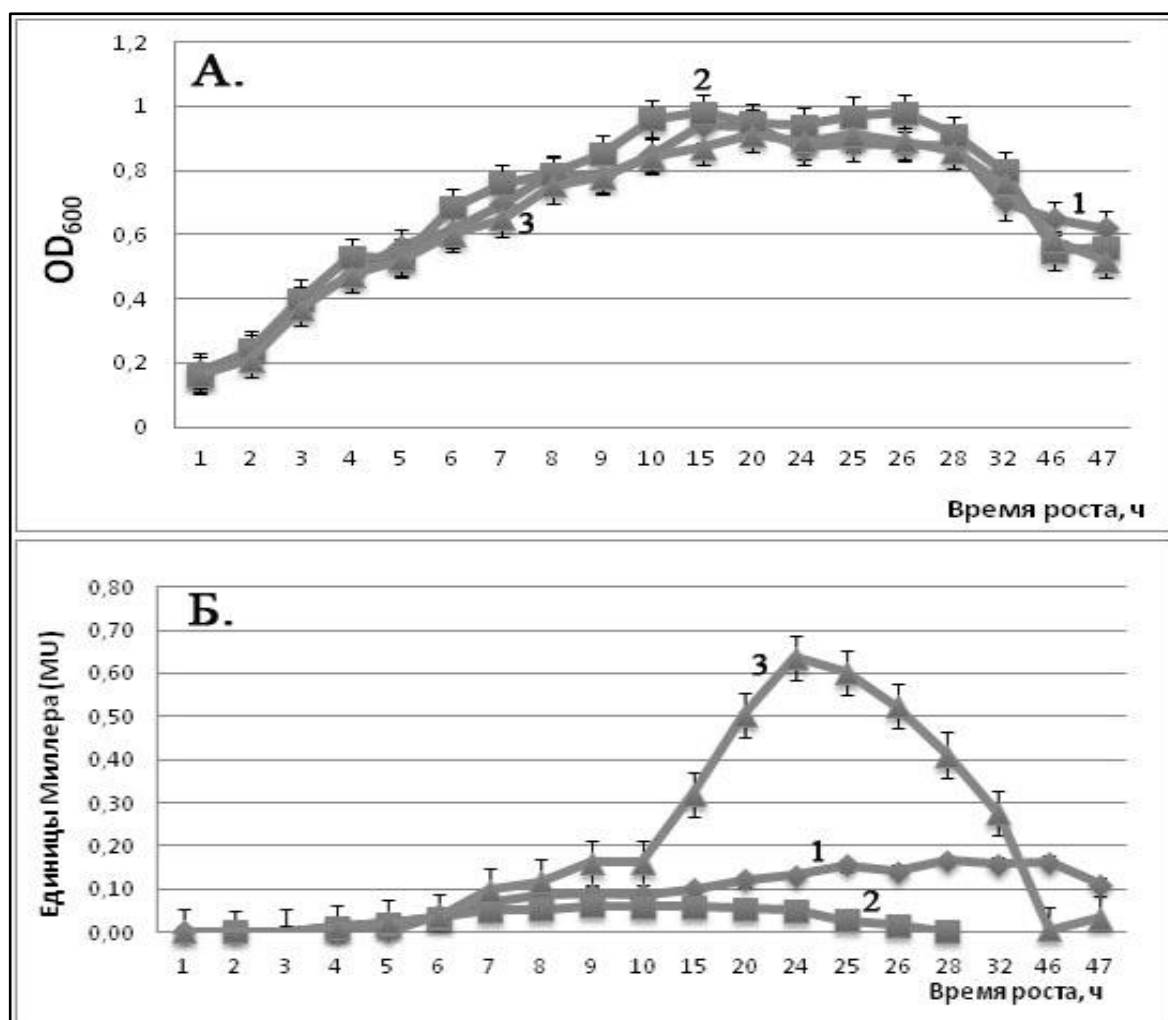


Рисунок 14 – Рост (А) и β -галактозидазная активность (Б) рекомбинантных штаммов *B. subtilis*. Штаммы с плазмидами рАМ4 с немодифицированной промоторной областью гена субтилизиноподобной протеиназы (1), рАМ41 с модифицированным сайтом 1 (2); рАМ42 с модифицированным сайтом 2 (3) промотора *aprVp* для связывания с фосфорилированным белком DegU~P.

β -галактозидазная активность в среде у всех рекомбинантных штаммов появлялась к 6-му ч роста. Максимальная активность фермента достигалась на 24 ч роста у штамма с модифицированным сайтом 2 в стационарной фазе роста культуры. Уровень активности репортерного белка, экспрессия которого происходила под контролем промотора с измененным сайтом 2 оказалась выше в 4.8 раза активности репортерного белка, синтезированного под управлением контрольного промотора. Изменение сайта 1 не приводило к повышению активности, а наоборот, подавляло экспрессию в 2.5 раза. Таким образом, модификация промоторной области гена в области сайта 2 субтилизиноподобной протеиназы *B. pumilus* привела к увеличению экспрессии белка в 5 раз.

Исследовали экспрессию репортерных генов по уровню накопления мРНК в клетках методом ПЦР в режиме реального времени (рисунок 15).

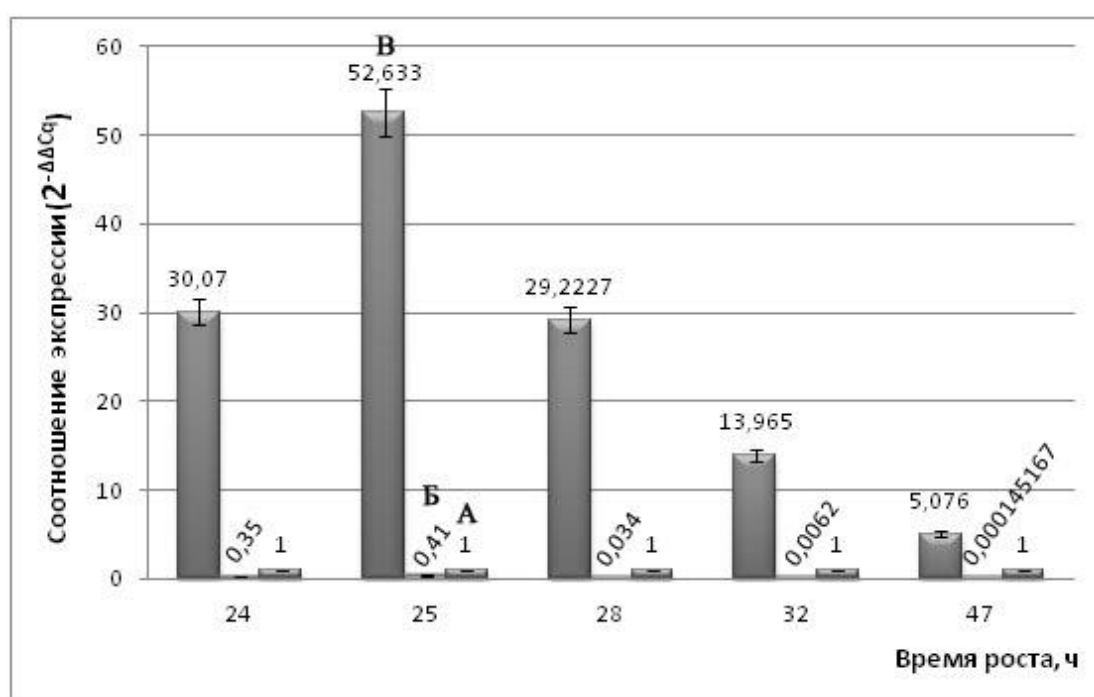


Рисунок 15 - Динамика изменения уровня мРНК в рекомбинантных штаммах *B. subtilis* 168 с трансформированными векторами rAM4 (А), rAM41 (Б) и rAM42 (Б).

Максимальную транскрипционную активность обнаружили у штамма с модифицированным сайтом 2 в промоторе гена субтилизиноподобной протеиназы на 25 ч роста. Уровень мРНК был выше контроля в 53 раза.

Мутация в сайте 1 промотора *aprBp*, наоборот, на 25 ч роста снизила уровень экспрессии репортерного гена по сравнению с штаммом без мутаций, в 2.5 раза. На 28 ч роста разница в экспрессии снизилась в 29 раз.

Таким образом, модификация сайта 2 в промоторе гена субтилизиноподобной протеиназы привела к увеличению транскрипционной активности гена в 53 раза и трансляционной активности в 5 раз. Эти данные указывают, что этот фрагмент промотора гена *aprBp* влияет на взаимодействие с транскрипционным фактором DegU~P и может быть определен как регуляторный сайт этого белка.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В системе *in vitro* мы установили, что двухкомпонентная система сигнальной трансдукции DegS-DegU принимает участие в активации экспрессии гена субтилизиноподобной протеиназы *B. pumilus*. Система Spo0A-фосфопередачи активирует гены субтилизиноподобной протеиназы и глутамилэндопептидазы. Определили направление и стартовые точки транскрипции генов сериновых протеиназ: нуклеотид «Т» в промоторе гена субтилизиноподобной протеиназы, нуклеотид «А» в промоторе гена глутамилэндопептидазы. Получили модифицированный промотор гена субтилизиноподобной протеиназы с консенсусным сайтом регуляции для узнавания фактором DegU~P, увеличивающий транскрипционную активность гена *aprBp* в 53 раза, уровень активности белка в культуральной жидкости в 5 раз. Полученный метод с модификацией промоторной области гена может быть применен при создании штаммов с повышенной экспрессией целевого белка, не сопровождаемой изменением его первичной структуры.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что мутации в регуляторных системах Spo0A-фосфопередачи и DegS/U снижают экспрессию генов сериновых протеиназ *B. pumilus* в 1.5 - 20 раз.
2. Установлено направление и стартовые точки транскрипции (+1) генов сериновых протеиназ *B. pumilus*: нуклеотид «Т» в промоторе гена субтилизиноподобной протеиназы, нуклеотид «А» в промоторе гена глутамилэндопептидазы
3. Установлено *in vitro* взаимодействие промотора гена субтилизиноподобной протеиназы с транскрипционными факторами Spo0A и DegU-P, промотора гена глутамилэндопептидазы с транскрипционным фактором Spo0A
4. Получен модифицированный промотор гена субтилизиноподобной протеиназы с консенсусным сайтом регуляции для узнавания фактором DegU-P, увеличивающий транскрипционную активность гена *aprBp* в 53 раза, трансляционную активность в 5 раз.

Публикации по теме диссертации в изданиях, рекомендованных ВАК

1. **Черёмин, А.М.** Оптимизация экспрессии субтилизиноподобной протеиназы *Bacillus pumilus* / А.М. Черёмин, Ч. Нямсурен, А.А. Тойменцева, М.Р. Шарипова // Биоорганическая химия. – 2014. – Т.40. - №6. – С. 752-757. (перечень ВАК), автора – 0,312 пл.
2. Балабан, Н. П. Свойства глутамилэндопептидазы *Bacillus pumilus* на разных фазах роста рекомбинантного штамма / Н.П. Балабан, Ю.В. Данилова, Т.Р.

Шамсутдинов, А.М. Марданова, **А.М.Черёмин**, Г.Н. Руденская, М.Р. Шарипова // Биоорг. химия. – 2013. – Т. 39. - №1. - С. 40-47. (перечень ВАК), автора -0,187 пл.

3. Тойменцева, А.А. Характеристика промоторов протеиназ *Bacillus pumilus* / А.А. Тойменцева, **А.М. Черёмин**, Е.О. Михайлова, М.Р. Шарипова // Вестник казанского технологического университета. - 2013. – Т.16. - №.20. – С. 191-194. (перечень ВАК), автора – 0,187 пл.

4. Данилова, Ю.В. Тромболитическая и фибринолитическая активность бактериальных протеаз / Ю.В. Данилова, **А.М. Черёмин**, А.И. Замалеева, А.М. Марданова, Н.М. Замалютдинова, М.Р. Шарипова // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2012. – Т.7. - С. 49-51. (перечень ВАК), автора – 0,187 пл.

5. **Черёмин, А.М.** Выделение регуляторных белков, активирующихся в условиях ограниченного роста бацилл / А.М. Черёмин, А.А. Тойменцева, А.Р. Сабинова, А.Р. Каюмов, А.Б. Маргулис, М.Р.Шарипова // Ученые записки Казанского государственного университета. – 2010. - Т.152. - Вып.4. - С. 156-158. (перечень ВАК), автора - 0,68 пл.

Другие публикации по теме диссертации

1. **Черёмин, А.М.** Идентификация *in vitro* регуляторных элементов генов сериновых протеиназ *Bacillus pumilus* / А.М. Черёмин, М.В. Захарова, М.Р. Шарипова // Всероссийская конференция «Протеолитические ферменты: структура, функции, эволюция». Петрозаводск. – 2014. - С.117.

2. **Черёмин, А.М.** Повышение экспрессии гена бактериальной протеиназы путем модификации его промотора / А.М. Черёмин, Тихонова А.О., Шарипова М.Р. // IV международная научно-практическая конференция «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине». Казань. – 2014. – С. 281.

3. **Черёмин, А.М.** Картирование промоторных областей генов сериновых протеиназ *Bacillus pumilus* / А.М. Черёмин, М.В. Захарова, М.Р. Шарипова // IV Международная 3D интернет-конференция «Актуальные проблемы биохимии и бионанотехнологий». Казань. – 2013. – С. 132.

4. **Черёмин, А.М.** Система экспрессии гена субтилизиноподобной протеиназы *Bacillus pumilus* / А.М. Черёмин, Б.Клотое, О.Н.Иголина, М.В. Захарова, М.Р. Шарипова // Международная конференция «Биология – наука XXI века». Москва. – 2012. – С. 1019-1020.

5. **Черёмин, А.М.** ДНК-белковое взаимодействие промотора гена металлопротеиназы *Bacillus intermedius* с факторами транскрипции / А.М. Черёмин, А.Р.Сабинова, А.А. Тойменцева, М.Р. Шарипова // Актуальные проблемы современной биохимии и молекулярной биологии. Минск. – 2010. – С. 67.

6. **Cheryomin, A.M.** The purification of *Bacillus subtilis* DegU and Spo0A regulatory proteins from the *Escherichia coli* recombinant strains / A.M.Cheryomin, A.R. Kayumov, A.A. Toymentseva, N. Pina, M.R. Sharipova // 13th annual Symposium for Biology Students of Europe “Symbiose 2009” Kazan. – 2009. - P.44.

7. **Cheryomin, A.M.** The purification of *Bacillus subtilis* DegU and Spo0A regulatory proteins from the *Escherichia coli* recombinant strains / A.M. Cheryomin, A.R. Kayumov, A.A. Toymontseva, N. Pina, M.R. Sharipova // XIV international conference “Microbial enzymes in biotechnology and medicine” devoted to the 20th anniversary of partnership between Kazan State University and Justus-Liebig Giessen University. Kazan. – 2009. -P.12.

8. **Cheryomin, A.M.** The purification of *Bacillus subtilis* DegU and Spo0A regulatory proteins from the *Escherichia coli* recombinant strains / A.M.Cheryomin, A.R. Kayumov, A.A. Toymontseva, N. Pina, M.R. Sharipova // 14th international conference «Microbial enzymes in biotechnology and medicine». Kazan. – 2009. - P.72.

9. **Cheryomin, A.M.** The purification of *Bacillus subtilis* DegU and Spo0A regulatory proteins from cells lysate of the *Escherichia coli* / A.M. Cheryomin, A.R. Kayumov, A.A. Toymontseva, N. Pina, M.R. Sharipova // Materials of IV Russian symposium called “Protein and Peptides”. Kazan. – 2009. - P.310.

10. Шамсутдинов, Т.Р. Физико-химические свойства глутамилэндопептидазы *B. intermedius*, продуцируемой рекомбинантным штаммом *B. subtilis* / Т.Р. Шамсутдинов, А.А. Тойменцева, Ю.В. Данилова, **А.М. Черёмин**, Н.П. Балабан, А.М. Марданова, М.Р. Шарипова // Материалы IV конгресса русского сообщества биохимиков и молекулярных биологов, Новосибирск. – 2008. - С.381.

11. Данилова, Ю.В. Характеристика глутамилэндопептидазы *Bacillus intermedius*, секретируемой на разных фазах роста рекомбинантного штамма *Bacillus subtilis* / Ю.В. Данилова, **А.М. Черёмин**, Т. Р. Шамсутдинов, М.Р. Шарипова // Материалы XLVI международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс». Новосибирск. – 2008. - С. 35.

СПИСОК ОСНОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота
РНК	Рибонуклеиновая кислота
кДНК	Комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота
мРНК	Матричная рибонуклеиновая кислота
УТР	Уридинтрифосфат
ONPG	О-нитрофенил-D-галактопиранозид
Z-Ala-Ala-Leu-pNa	Бензилоксикарбонил L-аланил-L-аланил-L-р-нитроанилид лейцин
Z-Glu-pNA	Пара-нитроанилид карбобензоксид-L-глутаминовой кислоты
ПЦР	Полимеразная цепная реакция
ПААГ	Полиакриламидный гель
FAM	Карбоксифлуоресцеин
кДа	Килодальтон
мкКи	Микрокюри
MU	Единица Миллера
у.е.	Условная единица

E-mail автора: andrey4eremin@mail.ru

Отзывы на автореферат просим высылать по адресу: 420008, Казань, ул. Кремлевская, 18, главное здание Казанского федерального университета, отдел аттестации научно-педагогических кадров, Ученому секретарю Диссертационного совета Д 212.081.08 Абрамовой Зинаиде Ивановне, факс: (843) 238-76-01. Email: ziabramova@mail.ru.